

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-335695

(43)Date of publication of application : 25.11.2003

(51)Int.Cl.

A61K 35/78

A23L 1/20

A23L 1/30

A61K 35/74

A61P 35/00

A61P 37/04

(21)Application number : 2002-142334

(71)Applicant : NIPPON BIO KK

(22)Date of filing : 17.05.2002

(72)Inventor : KAGEURA SADAO

KOBAYASHI YOICHI

SUZUKI MITSUMASA

OGAWA TADASHI

(54) IMMUNOENHANCING AGENT COMPOSED OF FERMENTED SOYBEAN, ANTITUMOR AGENT, PROCESSED FOOD, AND METHOD FOR PRODUCING FERMENTED SOYBEAN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a lactic fermentation product of soybean having high immunoenhancing effect and good taste.

SOLUTION: Soybean or its processed product is fermented by the coculture of lactobacillus and yeast. The lactobacillus at least contains Enterococcus faecalis properly combine with other cocci, bacilli or bifidus bacteria. The yeast is Saccharomyces cerevisiae and/or Saccharomyces rosei. The fermented soybean is produced by fermenting soya milk with the above microorganisms and the produced fermented liquid is neutralized with a calcium compound and dried to obtain a powdery fermentation product.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.05.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than

the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-335695

(P2003-335695A)

(43)公開日 平成15年11月25日(2003.11.25)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード*(参考)
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	J 4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/20		A 2 3 L 1/20	E 4 B 0 2 0
1/30		1/30	B 4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/74		A 6 1 K 35/74	G 4 C 0 8 8
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002-142334(P2002-142334)

(22)出願日 平成14年5月17日(2002.5.17)

(71)出願人 597106806

日本バイオ株式会社

東京都世田谷区梅丘3丁目14番14号

(72)発明者 藤浦 禎士

東京都渋谷区道玄坂1丁目19番11号セピア

ビル6階日本バイオ株式会社内

(72)発明者 小林 洋一

東京都渋谷区道玄坂1丁目19番11号セピア

ビル6階日本バイオ株式会社内

(74)代理人 100104754

弁理士 石川 英毅

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 大豆発酵物よりなる免疫増強剤、抗腫瘍剤、加工食品および大豆発酵物の製造方法

(57)【要約】

【課題】 免疫増強効果が高くかつ風味も良好な大豆の乳酸発酵物を得る。

【解決手段】 大豆又はその加工物を、乳酸菌と酵母菌との共棲培養で発酵させる。乳酸菌として少なくとも球菌であるエンテロコッカス・フェカリスを含み、他の球菌、桿菌、ビフィズス菌と適宜組合わせたものを用い、酵母菌としてはサッカロマイセス・セレビシエ及び／又はサッカロマイセス・ロゼイを用いる。また、大豆発酵物の製造方法としては、上記の菌により豆乳を発酵させて液状の発酵物を得る。さらに、この液状物をカルシウム化合物で中和した後乾燥して、粉末状の発酵物を得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 大豆又はその加工物を、乳酸菌と酵母菌とを共棲培養して発酵させた発酵物を有効成分とする免疫増強剤。

【請求項2】 大豆又はその加工物を、乳酸菌と酵母菌とを共棲培養して発酵させた発酵物を有効成分とする抗腫瘍剤。

【請求項3】 前記乳酸菌が、少なくともエンテロコッカス・フェカリスを含み、残余がストレプトコッカス・ラクチス、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ラクトバチルス・ブランタム、ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトバチルス・ブレビス、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ロングム及びビフィドバクテリウム・プレーベよりなる群から選ばれた1種又は2種以上の乳酸菌からなるものであり、かつ前記酵母菌が、サッカロマイセス・セレビシエ及び／又はサッカロマイセス・ロゼイからなるものである、請求項1記載の免疫増強剤又は請求項2記載の抗腫瘍剤。

【請求項4】 前記乳酸菌として、エンテロコッカス・フェカリス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ラクトバチルス・カゼイ及びラクトバチルス・サリバリウスの混合種を用い、かつ前記酵母菌として、サッカロマイセス・セレビシエとサッカロマイセス・ロゼイとの混合種を用いたことを特徴とする、請求項1記載の免疫増強剤又は請求項2記載の抗腫瘍剤。

【請求項5】 大豆又はその加工物を、乳酸菌と酵母菌とを共棲培養して発酵させた発酵物を主成分とする液状、粉末状又は固形の加工食品。

【請求項6】 前記乳酸菌が、少なくともエンテロコッカス・フェカリスを含み、残余がストレプトコッカス・ラクチス、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ラクトバチルス・ブランタム、ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトバチルス・ブレビス、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ロングム及びビフィドバクテリウム・プレーベよりなる群から選ばれた1種又は2種以上の乳酸菌からなるものであり、かつ前記酵母菌が、サッカロマイセス・セレビシエ及び／又はサッカロマイセス・ロゼイからなるものである、請求項5記載の加工食品。

【請求項7】 前記乳酸菌として、エンテロコッカス・フェカリス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ラクトバチルス・カゼイ及びラクトバチルス・サリバリウスの混合種を用い、かつ前記酵母菌として、サッカロマイセス・セレビシエとサッカロマイセス・ロゼイとの混合種を用いたことを特徴とする、請求項5記載の加工食品。

【請求項8】 請求項1～4のいずれかに記載の免疫増強剤若しくは抗腫瘍剤又は請求項5～7のいずれかに記載の加工食品に用いられる液状の大豆発酵物の製造方法であって、大豆を水に浸漬し又は煮沸して膨潤させた後粉砕する工程と、次いで該工程で粉砕された大豆を、必要に応じて加熱処理した後、圧搾して固液分離する工程と、次いで該工程で得られた液状の豆乳を加熱・殺菌する工程と、次いで該工程で殺菌された豆乳に、必要に応じて酵素スターターを添加し、乳酸菌及び酵母菌の菌種を添加して、所定条件で共棲培養・発酵させる工程と、発酵後該豆乳を再度加熱して発酵を停止させる工程とを具備することを特徴とする大豆発酵物の製造方法。

【請求項9】 請求項1～4のいずれかに記載の免疫増強剤若しくは抗腫瘍剤又は請求項5～7のいずれかに記載の加工食品に用いられる粉末状の大豆発酵物の製造方法であって、請求項7記載の各工程により液状の大豆発酵物を製造した後、これに水酸化カルシウム及び／又は炭酸カルシウムを添加して大豆発酵物中の乳酸を中和し、その後該中和液を乾燥して、液中の固形物を粉末化することを特徴とする大豆発酵物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、大豆を乳酸菌と酵母菌で発酵させた発酵物よりなる免疫増強剤、抗腫瘍剤及び加工食品と、これに用いる大豆発酵物の製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】マクロファージを始めとする白血球の活性を高めて、生体の免疫機能を強化することが、各種感染症、癌のみならず、動脈硬化、糖尿病、各種アレルギー等の予防と治療に重要なかわりを持つことが知られている。近年、高齢化に伴う生体機能の低下や、食生活の偏り、ダイエット指向等の栄養上の理由からも、免疫力の低下が問題になっており、何らかの形で免疫増強剤の服用を必要とする場合が生じている。

【0003】従来から、合成化合物や天然物由来の免疫増強剤が多数提案されているが、長期間服用しても副作用のない天然物由来のものが好ましく、かかる免疫増強物質の一つとして、乳酸菌が注目されている。

【0004】乳酸菌のうち、ある種の高免疫賦活作用を示すことが知られており、この効果の高い菌種についての提案（例えば特開平9-30981号、特開2001-48796号公報など）や、これら乳酸菌の菌体又はその処理物の経口摂取を効率的又は容易にする手段についての提案（例えば特開平6-80575号、特開平11-199494号公報など）が多数なされている。

【0005】しかしながら、乳酸菌の菌体そのものを免疫増強剤として用いる場合、必要な菌体量が多くなり、コスト高になるという問題がある。また、乳酸菌の培養

には大量の培地が必要で、使用後の培地は強い酸性を示すため、廃棄物処理という点からも問題が生じている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】乳酸菌は、乳原料や野菜、果実等の植物性食品を乳酸発酵させることによって、培養・増殖させることができる。この場合は、培地に相当する食品をそのまま栄養素として摂取することができ、上述のような廃棄物処理という問題は生じない。

【0007】免疫増強作用に着目して、植物性の素材を乳酸発酵させたものについての提案は比較的少ないが、例えば特開平9-40566号公報には、米糠及び／又は玄米粉を原料として得られる乳酸菌発酵物であって、複数種の栄養素を含有する免疫増強剤が提案されている。しかし、この提案のものは、免疫増強剤としての性能も必ずしも十分でなく、食品として摂取する場合の風味にも問題が残されている。

【0008】本発明者らは、発酵原料の食品として大豆に着目し、免疫増強等の薬効も高く、かつ風味も良好な乳酸発酵食品を得る手段について、種々検討を行った。乳酸菌には多数の菌種があるが、発酵物の免疫増強作用の高い菌種は限定される。一方、発酵物の風味という観点からも菌種は限定され、薬効と風味の両面を満足する菌種を選択することは難しい。さらに、大豆の乳酸発酵物は発酵度のばらつきが生じ易く、発酵度を安定させるために、何らかの工夫が必要ながことが知見された。

【0009】本発明者らは、乳酸菌の菌種を適切に選択し、かつ乳酸菌以外の菌と混合発酵させることにより、上記の課題を全て解決しうることを見出し、本発明を完成させた。すなわち本発明は、大豆を発酵原料として、乳酸菌の菌種を選択と他の菌との共棲培養により、免疫増強等の薬効に優れ、かつ風味も良好で経口摂取し易い薬剤と加工食品並びにその製造方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため本発明は、大豆又はその加工物を、乳酸菌と酵母菌とを共棲培養して発酵させた発酵物を有効成分とする免疫増強剤を提供する。

【0011】この大豆発酵物は、白血球のサイトカイン産生能を高めて免疫活性を増強するのみならず、マクロファージの貪食能を亢進させるため、悪性腫瘍（癌）の発生、増殖・転移の抑制にも有効である。したがって本発明は、抗腫瘍剤をも提供する。

【0012】また、この大豆発酵物は、乳酸菌と酵母菌とを共棲培養・発酵させるため、発酵度が安定し易く、乳酸菌単体で発酵物させた場合よりも免疫活性や抗腫瘍効果が安定する。また、発酵物は風味が良好で、単体で又は賦形剤で成形して服用する場合にも飲み易いという特色を有する。

【0013】さらに本発明は、大豆又はその加工物を、

乳酸菌と酵母菌とを共棲培養して発酵させた発酵物を主成分とする液状、粉末状又は固形の加工食品を提供する。この加工食品は、風味が良好であるのみならず、大豆中のアレルギー原因物質（アレルゲン）がほとんど検知されない程度まで、低アレルゲン化されていることが特徴である。

【0014】上記本発明の免疫増強剤、抗腫瘍剤又は加工食品においては、前記乳酸菌は、少なくともエンテロコッカス・フェカリスを含み、残余がストレプトコッカス・ラクチス、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ラクトバチルス・ブランチウム、ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトバチルス・ブレビス、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ロングム及びビフィドバクテリウム・ブレーベよりなる群から選ばれた1種又は2種以上の乳酸菌からなるものであり、かつ前記酵母菌が、サッカロマイセス・セレビシエ及び／又はサッカロマイセス・ロゼイからなるものであることが好ましい。

【0015】乳酸菌及び酵母を上記のように選択することにより、エンテロコッカス・フェカリスが有効に作用して、高い免疫賦活活性及び抗腫瘍効果が得られる。また、エンテロコッカス・フェカリスのみでは、良好な風味の発酵物が得られないが、上記の乳酸菌と酵母菌の組み合わせにすることにより、さわやかな酸味を有する風味の良好な発酵物を得ることができる。

【0016】さらに、前記本発明の免疫増強剤又は加工食品においては、前記乳酸菌として、エンテロコッカス・フェカリス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ラクトバチルス・カゼイ及びラクトバチルス・サリバリウスの混合種を用い、かつ前記酵母菌として、サッカロマイセス・セレビシエとサッカロマイセス・ロゼイとの混合種を用いたものであることがより好ましい。すなわち、この乳酸菌と酵母菌の組み合わせは、免疫活性等の薬効を高め、かつ風味を良好にする上でさらに好ましい。

【0017】発明の大豆発酵物の製造方法の第一は、上記のいずれかの免疫増強剤、抗腫瘍剤又は加工食品に用いられる液状の大豆発酵物の製造方法であって、大豆を水に浸漬し又は煮沸して膨潤させた後粉砕する工程と、次いで該工程で粉砕された大豆を、必要に応じて加熱処理した後、圧搾して固液分離する工程と、次いで該工程で得られた液状の豆乳を加熱・殺菌する工程と、次いで該工程で殺菌された豆乳に、必要に応じて酵素スターターを添加し、乳酸菌及び酵母菌の種菌を添加して、所定条件で共棲培養・発酵させる工程と、発酵後該豆乳を再度加熱して発酵を停止させる工程とを具備することを特徴とする大豆発酵物の製造方法である。

【0018】このように、豆乳を発酵原料にして得た液

状の製品は、瓶に詰めて保存、運搬等に便利なこと、飲料として摂取し易いこと、大豆としての栄養価も十分残されていることなどの利点を有する。また、豆乳の状態

で発酵させることにより、発酵が促進されかつ発酵度が安定するため、薬効と風味がともに良好な製品をより安定して製造し得るという利点を有する。

【0019】また、本発明の大豆発酵物の製造方法の第二は、上記のいずれかの免疫増強剤、抗腫瘍剤又は加工食品に用いられる粉末状の大豆発酵物の製造方法であって、第一発明の製造方法の上記各工程により液状の大豆発酵物を製造した後、これに水酸化カルシウム及び／又は炭酸カルシウムを添加して大豆発酵物中の乳酸を中和し、その後該中和液を乾燥して、液中の固形物を粉末化することを特徴とする大豆発酵物の製造方法である。

【0020】上記の粉末状の製品は、とくにハンドリングや貯蔵に便利である。しかし、液状の大豆発酵物を単に乾燥したのみでは、乳酸の作用により飴状の高粘度の固形物が生成して、粉末化が難しい。上記のようなカルシウム塩で乳酸を中和して乾燥すれば、きわめて容易に粉末化することができ、カルシウム分とともに服用することができるとい

利点を有する。

【0021】  
【発明の実施の形態】まず、本発明の免疫増強剤又は加工食品に用いる大豆発酵物について説明する。発酵原料の大豆は、固形の豆（豆の形状のまま又は粉碎したもの）であってもよいが、発酵を均一かつ速やかに進行させるという観点からは、液状又は懸濁液状に加工したものを

用いることが好ましい。  
【0022】すなわち、サヤから外した枝豆又は乾燥大豆を加

水膨潤させて（必要に応じて茹でてよい）破砕機で粉碎し、ドロドロの懸濁液状のものを発酵原料とすればよい。さらに、後記の製造方法の説明において述べるように、この懸濁液を固形分（オカラ）と液状分（豆乳）に分離し、この豆乳分を発酵原料とすることがより好ましい。

【0023】原料の大豆の品種については、とくに限定を要しない。なお、本発明の発酵原料である「大豆又はその加工物」には、上述のように、大豆を加

水膨潤させたもの、茹でたもの、懸濁液状に粉碎したもの、破砕物を固液分離したもの等の全てが含まれる。  
【0024】本発明に用いる大豆発酵物は、上述の発酵原料を乳酸菌と酵母菌とを共棲培養して発酵させることを特徴とする。ここで「共棲培養」とは、発酵前の種菌中に乳酸菌と酵母菌が所定の比率で含まれ、かつ発酵の環境を双方の菌の培養に適した条件にすることを言う。このように乳酸菌と酵母菌とで発酵させることにより乳酸菌単独での発酵の場合より、免疫増強活性を高めることを可能にし、かつ発酵物の風味を大幅に改善したことが本発明の特徴である。

【0025】以下、本発明で用いる乳酸菌と酵母菌につ

いて説明する。本発明のように免疫増強活性の高い大豆発酵物を作る上で、乳酸菌の菌株の選択が重要である。免疫増強活性は一般に乳酸球菌が高く、乳酸桿菌やビフィズス菌は弱いと言われている。本発明者らの知見によれば、乳酸球菌の中でも免疫増強活性の最も高いのはエンテロコッカス・フェカリスである。

【0026】したがって、本発明においては、少なくともエンテロコッカス・フェカリスを含む乳酸菌を用いる。しかしながら、エンテロコッカス・フェカリスは豆乳培地によく増殖するものの、pHの下がりが悪く、大豆発酵物としては酸味が弱く、中途半端な味になってしまう。また特有の発酵臭があり、大豆の青くさみも強く残って味が悪い。

【0027】本発明者らは味の改良法につき種々検討した結果、免疫増強活性の高いエンテロコッカス・フェカリスと、到達pHのより低い乳酸球菌、乳酸桿菌、ビフィズス菌とを混合培養した乳酸菌で発酵させれば、上記の問題を解決しうることを知見した。

【0028】この場合、混合する乳酸菌として、乳酸球菌ではストレプトコッカス・ラクチス、ストレプトコッカス・サーモフィルス、乳酸桿菌ではラクトバチルス・ブランチウム、ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトバチルス・ブレビス、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ビフィズス菌ではビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ロングム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ等の酪農乳酸菌や腸内由来の乳酸菌を広く用いることができ、これらのうちの1種でも2種以上であってもよい。

【0029】次に、酵母菌としては、サッカロマイセス・セレビシエ及び／又はサッカロマイセス・ロゼイを用いる。これらの酵母菌は、食品に用いられる酵母菌の代表的なものであり、かつ大豆の乳酸発酵物の風味を改善する効果及び乳酸発酵の発酵度を安定化させる効果も良好なためである。

【0030】さらに、できた大豆発酵物の酸味の質、大豆の青臭さの消去、発酵臭の良さ等の総合的な評価では、乳酸菌として、エンテロコッカス・フェカリス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ラクトバチルス・カゼイ及びラクトバチルス・サリバリウスの4種の混合種を用い、かつ酵母菌として、サッカロマイセス・セレビシエとサッカロマイセス・ロゼイとの2種の混合種を組み合わせて用いることが最も好ましい。なお、このような混合種を用いる場合、種菌中に全ての菌がある比率で含まれており、かつ発酵後に特定の菌の割合が著しく減少することのないような発酵条件とすることが必要である。

【0031】上記の大豆発酵物は、通常は液状又は懸濁液状であるが、これを乾燥して粉末状にしてもよい。粉末状のものは、貯蔵やハンドリングにとくに便利であ

る。

【0032】本発明の免疫増強剤又は抗腫瘍剤は、この大豆発酵物を有効成分として含有するものであればよく、液状若しくは懸濁液状の大豆発酵物又はその乾燥粉末をそのまま服用してもよいが、これに賦形剤（乳糖、でん粉、デキストリン、ゼラチン、セルロース類など）を添加して、錠剤、顆粒、カプセル剤等の固形剤として服用してもよい。服用量はとくに限定を要しない。すなわち、過剰に服用しても、副作用の懸念は一切無く、栄養分として有効になるものであるから、食品と同様の感覚で服用すればよい。

【0033】また、本発明の加工食品は、液状の大豆発酵物を豆乳と同様の感覚で飲料としてもよい。また、大豆発酵物の乾燥粉末は、そのまま食用とすることもできるが、水や乳飲料に添加して飲用に供しても良く、他の加工食品に添加する食品添加剤として用いてもよい。なお、本発明の加工食品を「発酵物を主成分とする」と規定した理由は、上記の大豆発酵物の他に、風味の改善を目的として添加される糖類や果汁等の調味成分を含んでも良いとの意である。

【0034】上記の大豆発酵物を食品とする場合に、とくに特記すべき点は、これが低アレルギー化大豆加工品になっているということである。すなわち、大豆に含有される難分解性の蛋白質 G<sub>y</sub> m Bd 60K及び30K が大豆アレルギーの原因物質であることが知られているが、後記実施例に示すように、本発明の方法により発酵させた大豆は、前記の蛋白質が分解され、その含有量が大幅に低減されている。したがって、大豆アレルギーを伴うアトピー症等のアレルギー体質の人でも、発症の懸念なく本発明の加工食品を経口摂取できることが確かめられている。

【0035】次に、本発明に用いられる大豆発酵物の製造方法について説明する。まず、液状の大豆発酵物を製造するための本発明の方法は、大豆を水に浸漬し又は煮沸して膨潤させた後粉砕する工程（粉砕工程）と、次いで該工程で粉砕された大豆を、必要に応じて加熱処理した後、圧搾して固液分離する工程（固液分離工程）と、次いで該工程で得られた液状の豆乳を加熱・殺菌する工程（殺菌工程）と、次いで該工程で殺菌された豆乳に、必要に応じて酵素スターターを添加し、乳酸菌及び酵母菌の種菌を添加して、所定条件で共棲培養・発酵させる工程（発酵工程）と、発酵後該豆乳を再度加熱して発酵を停止させる工程（発酵停止工程）とを具備することを特徴とする。

【0036】上記の各工程についてさらに説明を加えると、乾燥大豆を原料とする場合には、予め水中に浸漬して膨潤させておく必要がある。また、必要に応じて粉砕前に原料大豆を茹でておいてもよい。粉砕工程は、通常はミキサーを用いるが、その方法についてはとくに限定を要しない。粉砕時には、被砕物を所定量（被砕物と

量程度）の水で希釈しても良い。

【0037】液状の大豆発酵物を製造する場合には、この破砕大豆を固液分離して、液状の豆乳の部分のみを発酵させることが好ましい。固液分離の方法はとくに限定を要しないが、通常は布袋のような炉布を用いて、液状物を絞り出し、固形物を袋内に残留させるような方法をとる。なお、固液分離の前に、破砕後の大豆を加熱処理しておいてもよい。

【0038】殺菌工程は、発酵工程における雑菌の繁殖を防止するためのもので、通常の殺菌条件、例えば80～120℃に数分～十数分間程度保持すれば良い。発酵工程（又は殺菌工程）に先立って、粉碎物に加水してpH調整しておくことが好ましい。

【0039】発酵工程では、乳酸菌と酵母菌の双方を添加するが、添加に先立って（又は添加と同時に添加後に）、必要に応じて酵素スターター（例えば、アミラーゼ、プロテアーゼなど）を添加する。発酵条件は乳酸菌と酵母菌の双方の培養に適した条件であることが必要であるが、一般的には、乳酸菌と酵母菌の培養条件はほぼ同じなので、通常は乳酸菌の培養条件に従えばよく、菌種によっても若干相違するが、密閉容器内（暗所）で20～35℃で20～100時間程度保持すればよい。また、発酵を停止させるためには、上記の発酵物を70～100℃に数分間程度保持する加熱工程を加えればよい。

【0040】次に粉末状の発酵食品を製造する方法は、上記と同じ、粉砕工程、固液分離工程、殺菌工程、発酵工程及び発酵停止工程を順次実施して、液状の大豆発酵物を製造するが、発酵停止後に中和剤を添加して発酵生成した乳酸を中和し、pHを6～8程度にした後乾燥して液中の固形物を粉末化することを特徴とする。

【0041】乾燥に先立って、中和剤で中和する理由は、乳酸発酵液が多量の乳酸を含むため、このままで乾燥すると飴状になって、粉末化が困難となるためである。なお、中和剤としては、カルシウム化合物、とくに炭酸カルシウム及び／又は水酸化カルシウムが好適であり、乾燥方法としては、凍結乾燥法（又は噴霧乾燥法）が好適である。

【0042】

【実施例】（実施例1）同一の豆乳を発酵させた発酵飲料を製造するに際して、本発明例としては、乳酸菌と酵母菌で共棲培養したケース、比較例としては乳酸菌又は酵母菌のみで発酵させたケースで、それぞれの豆乳発酵飲料を被検物質として風味テストを行った。本発明例及び比較例のサンプルの作成条件は下記の通りである。

【0043】本発明例1（2種類の乳酸菌と酵母菌の共棲培養）

北海道産丸大豆（品種：鶴の子）200gと水で一晩膨潤させた後に、加水しミキサーで2分間粉砕した。さらに、加水して、総量を1.6Lとし、ナベで攪拌しながら5分

間煮沸した。これを布袋に入れ、濾過した濾液を豆乳とした。この豆乳1Lに乳糖を30gを添加し、滅菌して培地を調製した。これにセルラーゼ（セルラーゼ・オノスカ3S、ヤクルト薬品工業社製）およびプロテアーゼ（プロテアーゼONS、エイチビィアイ株式会社製）をそれぞれ100mg添加し、エンテロコッカス・フェカリス、ラクトバチルス・ブランタムおよびサッカロマイセス・セレビシエのスターターをそれぞれ0.1%ずつ接種し、30℃で3日間培養した。培養終了液のpHと生菌数を測定した後に、80℃で10分間加熱し、冷却した。この被検物質において風味テストを行った。

【0044】本発明例2（5種類の乳酸菌と酵母菌の共棲培養）

実施例1と同様に調製した滅菌培地に、セルラーゼおよびプロテアーゼを添加し、エンテロコッカス・フェカリス、ラクトバチルス・ブランタム、ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ラクトバチルス・カゼイおよびサッカロマイセス・セレビシエのスターターを接種し、以下同様に培養・加熱処理を行った。なお、この被検物質においては、後記実施例2に示すように、風味テストの他に免疫増強活性およびアレルギー物質等の測定を行った。

【0045】本発明例3（4種類の乳酸菌と2種類の酵母菌の共棲培養）

実施例1と同様に調製した滅菌培地に、セルラーゼおよびプロテアーゼを添加し、エンテロコッカス・フェカリス、ラクトバチルス・ヘルベティクス、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・サリバリウス、サッカロマイセス・セレビシエ及びサッカロマイセス・ロゼイの\*

\*スターターを接種し、以下同様に培養・加熱処理を行った。

【0046】比較例1（本発明例1の未発酵の豆乳培地）

比較例2～6（1種の乳酸菌で発酵）

本発明例1と同じ豆乳培地で、比較例2はエンテロコッカス・フェカリスで発酵させた被検物質、比較例3はストレプトコッカス・ラクチスで発酵させたもの、比較例4はラクトバチルス・ブランタムで発酵させたもの、比較例5はラクトバチルス・サリバリウスで発酵させたもの、比較例6はビフィドバクテリウム・ブレーベで発酵させたもの。

【0047】比較例7～8（1種の酵母菌で発酵）

本発明例1と同じ豆乳培地で、比較例7はサッカロマイセス・セレビシエで発酵させた被検物質、比較例8はサッカロマイセス・ロゼイで発酵させたもの。比較例9（2種の乳酸菌で発酵）

本発明例1と同じ豆乳培地で、エンテロコッカス・フェカリス及びラクトバチルス・ブランタムで発酵させたもの。

【0048】風味テストは成人男女各々6名を被験者とし、5段階評価を行った。すなわち、5点：非常に美味しく飲みやすい、4点：飲み易い、3点：普通、2点：まずい、1点：非常にまずいとし、12名の平均値を表1に示した。また、風味に関する自由な印象として、最も一般的な評価を併せて表1に示す。

【0049】

【表1】

豆乳培地を乳酸菌と酵母で単独および共棲培養した培養物の発酵性状と風味評価

試験区分	培養後（3日間） pH	風味評価	
		自由描写	点数
本発明例1	3.72	さわやかなコク味	4.2
本発明例2	3.75	深みのあるコク味	4.5
本発明例3	3.70	さわやかな深みのあるコク味	4.7
比較例1	6.85	—	—
比較例2	4.83	豆乳臭、まずい	2.1
比較例3	4.55	—	—
比較例4	3.89	さわやかな酸味、青臭い	3.0
比較例5	4.19	—	—
比較例6	4.10	—	—
比較例7	6.04	酵母臭、まずい	1.3
比較例8	6.22	—	—
比較例9	4.01	さわやかな酸味、豆臭	3.0

【0050】豆乳培地での乳酸菌の増殖性は培地のpH（生成酸量と相関している）を測定することにより調べることが出来る。表1にその結果を示した。エンテロコッカス・フェカリスやストレプトコッカス・ラクチスの増殖性は悪く（比較例2および3）、ラクトバチルス・ブランタムやビフィドバクテリウム・ブレーベ等で

は比較的良好な増殖性を示し、pHが低下した。（比較例4、5および6）。また、酵母で単独培養した場合には、ほとんど酸を生成せず、pHは下がらなかった。

【0051】しかし、エンテロコッカス・フェカリス、ラクトバチルス・ブランタムおよび酵母菌による共棲培養を行うと、pHは3.80以下に低下し、共棲



培養により、2種の乳酸菌のみの場合より、増殖が促進されていることが確認された（本発明例1及び比較例9）。また、4種類の乳酸菌と2種類の酵母菌での共棲培養の場合には、さらにpHは低下し、乳酸菌群の増殖が促進されていることが明らかとなった（本発明例3）。

【0052】次に風味テストの結果について説明する。これらの発酵物の中から代表的なもの7種類（本発明例1、2、3及び比較例2、4、7、9）を選んで風味評価を行った。その結果を表1に示した。乳酸菌や酵母単独で培養した発酵物は、豆乳臭、青臭さおよび酵母臭が強く、評価が低かった（比較例2、4および7）。

【0053】また、2種類の乳酸菌の混合培養でも豆臭は消えなかったが、酵母を加えて培養すると豆臭は消え、評価が高くなった（比較例9および本発明例1）。さらに、5種類の乳酸菌と酵母菌の共棲培養発酵物では、さわやかな酸味に深みのあるコク味が加わって評価も高くなり（本発明例2）、4種類の乳酸菌と2種の酵母菌の共棲培養発酵物では評価はさらに高くなった（本発明例3）。

【0054】これらのことより、大豆を複数の乳酸菌と酵母を共棲培養発酵することにより、乳酸菌の増殖性が高まり、大豆特有の臭みが消去されるだけでなく、優れた風味を伴う素材に変わることが明らかとなった。

【0055】（実施例2）実施例1の本発明例2の被検物質（以下、新乳酸菌産生物質という）について、免疫増強活性、悪性腫瘍転移抑制活性とアレルギー原因物質濃度の測定を行なった。

【0056】(1)測定方法

①免疫増強活性の測定：

A. マクロファージからのNO産生能促進活性  
d d Y系雄性マウスの腹腔よりマクロファージを採取し、RPMI 1640培地に懸濁した後に（ $5 \times 10^6$  cells/ml）、96穴マイクロプレートに播種し、種々濃度の新乳酸菌産生物質と24時間培養した。マクロファージの活性化の指標を一酸化窒素（NO）産生にて測定し、細胞毒性の有無もMTT法により併せて検討した。

【0057】B. マクロファージ貪食能亢進活性  
d d Y系雄性マウスの腹腔よりマクロファージを採取し、RPMI 1640培地に懸濁した後に、96穴マイクロプレートに播種し、種々濃度の新乳酸菌産生物質と37℃、1時間培養した後に、1mg/ml BioBeads BODYPYを添加し、1.5時間保温した。洗浄した後に、取り込まれていないBioBeadsを0.2%トリパンブルーで消光し、蛍光検出器 Typhoon 8600にて（Ex. 532 nm, Em. 526 nm, PMT.530 V）検出し定量した。

【0058】②腫瘍転移抑制活性の測定：東北大学医学部加齢医学研究所の細胞資源バンクより分与されたマウスメラノーマ細胞（マウス黒色細胞腫）B16-F10を、C57 BL/6 雌性マウス（清水実験材料より購入）に静脈注射

し、その後継続的に被検物質を経口投与して、2週間後の腫瘍形成コロニー数を測定し、転移抑制活性を評価した。

【0059】東北大加齢研より分与された高転移株B16-F10株を、10%胎児牛血清含有RPMI 1640培地を用い対数増殖期になるまで培養した。その後に、洗浄し、細胞を $5 \times 10^6$  cells/mlにリン酸緩衝液に懸濁した。水（コントロール群）、1%又は2%新乳酸菌溶液投与群それぞれの、3日間自由摂取させたC57BL/6 雌性マウスに、上記の細胞懸濁液を200μl 静脈内投与した（ $5 \times 10^5$  cells/匹）。その後水もしくは1~2%新乳酸菌産生物質を14日間自由摂取させ、肺メラノーマ転移部位を観察し、撮影した後に腫瘍形成コロニー数を計測した。尚、この動物実験は、動物実験倫理規定に基づき行った。

【0060】③アレルギー原因物質濃度の測定

ウエスタンブロッティング法により、大豆アレルギーの検出を行った。原料である脱脂大豆抽出液（大豆培地）および大豆発酵物をLaemmli緩衝液に溶解し、電気泳動用被検物質とした。電気泳動装置は、BioRad社製Protein 3、電源装置としてPowerPac200を使用し、ブロッティング装置はアトー社製を用いた。また、電気泳動用ゲルとして12%ポリアクリルアミドゲル（85 x 55 x 1 mm<sup>3</sup>）を使用した。

【0061】調製したそれぞれの被検物質および分子量標準マーカーをゲルに重層し、200V、30分間泳動した。その後、ニトロセルロース膜にゲル上で分離されたタンパクを転写し、転写膜を抗Gly m Bd 30K抗体（5000倍希釈）で処理した。転写膜を洗浄した後に、HRP標識抗マウスIgG抗体で処理し、ECLキット（アマシャム社）にて発光させ、HyperFilm（アマシャム社）で検出した。尚、大豆タンパクのアレルゲン性は、分子量30kDaのGly m Bd 30Kと相関性があることが知られていることより、大豆のアレルゲン性検出の指標に用いた。

【0062】(2)評価結果

①免疫増強活性の測定：

A. マクロファージからのNO産生能促進活性  
新乳酸菌産生物質及び比較対照薬（LPS）のNO産生促進活性の測定結果を、表2に示す。表に見られるように、新乳酸菌産生物質は、低濃度よりマクロファージを活性化させることが知れた。また、マクロファージに対する細胞毒性は全く認められなかった。これらのことより、新乳酸菌産生物質は有用な免疫力増強物質・素材であることが明らかとなり、免疫力不足により発症する疾患の予防または改善に優れた物質であることが示唆された。

【0063】さらに、予備試験レベルでの検討において、免疫力を低下させたマウス（副腎皮質ホルモン ハイドロコチゾン投与により作成）に、1 q/kg の用量で5日間連続投与したところ、生体の免疫能に關与する

臓器の一つである脾臓の縮小を抑制した。これらのことより、脾臓縮小による免疫力不足を改善および予防できることが示唆された。

\*【0064】  
【表2】

\*

新乳酸菌生産物質の免疫力増強作用 (NO産生能亢進)			
サンプル	濃度 (μg/ml)	NO 産生量 (μM)	免疫力増強活性 (倍)
Normal	—	1.3	—
比較対照薬 (LPS)	10	44.5	34.2
新乳酸菌生産物質	3	9.5	7.3
	30	22.6	17.3
	100	50.8	38.6

結果は全て四例の平均値

【0065】B. マクロファージ食能亢進活性  
新乳酸菌生産物質のマクロファージ食能亢進活性の測定結果を、表3に示す。表に見られるように、新乳酸菌生産物質は、低濃度10 μg/mlよりマクロファージの食能を有意に亢進させ、濃度依存的に亢進させることが※

※知れた。さらに、マクロファージを初期の段階で、活性化を促進させ、食能を亢進させることが明らかとなった。

【0066】  
【表3】

新乳酸菌生産物質の免疫力増強作用 (食能亢進)			
サンプル	濃度 (μg/ml)	Optical Density (/1000)	免疫力増強活性 (倍)
Normal	—	665.1±32.2	—
新乳酸菌生産物質	3	702.1±32.3	1.06
	10	857.9±30.2*	1.29
	30	959.6±30.9**	1.44
	100	1448.1±42.3**	2.18
	300	1507.2±22.2**	2.27

結果は全て5例の平均値±標準偏差、食能増強活性はNormalを1として計算した。\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  (Dunnett 2 tail 有意差検定法による)

【0067】新乳酸菌生産物質は、従来の天然物由来の免疫活性増強剤と比較して同等以上の食能亢進活性を有しており、細胞毒性が無く(無毒)でマクロファージ活性化作用を有していることが明らかとなっていることから、免疫力増強物質として有用であることが示唆された。

★で顕著に、転移コロニーを形成しており、それらを計測した結果を表4に示した。新乳酸菌生産物質投与群投与群において、濃度依存的に腫瘍転移コロニーを有意に抑制した。これらの結果より、新乳酸菌生産物質は、免疫力増強作用を有した癌転移抑制物質として有用な素材であることが明らかとなった。

【0068】②腫瘍転移抑制活性の測定：黒色細胞腫などの腫瘍細胞は、酸素要求性が高いことより、肺において★

【0069】  
【表4】

新乳酸菌生産物質の癌転移抑制活性			
サンプル	濃度 (%)	腫瘍転移コロニー数 (個)	抑制率 (%)
コントロール (水)	—	162±16	—
新乳酸菌生産物質	1	81±17**	49.6
	2	46±6**	71.2

結果は全て10例の平均値±標準偏差、\*\* $p<0.01$

【0070】現在、癌治療の補助療法として、アガリクス、メシマコブなど多糖類系の免疫賦活機能性食品が注目を浴び、医療・民間療法的に用いられている。しかし、これらは天然素材であるため日照時間・降雨量・潮流・海塩濃度・プランクトンなど制御できない気象状況など自然界の要素により、有効成分含有量の多少、品質の劣悪が左右される。新乳酸菌生産物質は、厳重な菌体管理および厳密な培養条件、さらに、安定した品質の大豆を使用しているので、ロット間での誤差がほとんど無

く生産されることより、これからの免疫増強・癌転移物質であることが期待される。

【0071】③アレルギー原因物質濃度(又はアレルギー活性)の測定：大豆培地、大豆発酵物をウェスタンブロッティング法により、大豆アレルゲンGly m Bd 30Kの検出を行なった結果を図1に示す。同図において、1は大豆培地、2はGly m Bd 30K標準タンパク質、3は大豆発酵物(10 μg)、4は大豆発酵物(100 μg)を示す。

【0072】図に見られるように、大豆培地には、分子量約30kDa付近にバンドが認められたが、大豆発酵物質には、ほとんど認められなかった。これらのことより、大豆培地のアレルゲンは、発酵により、検出限界以下まで分解・消去されることが明らかとなり、また、大豆のアレルゲンはGly m Bd 30Kと相関性が認められていることから（辻ら、Food Sci. Technol. Int. Tokyo, 3, 145-149, 1997）、本実験に供した大豆発酵物質は、アレルゲン性が低いものと考えられる。

【0073】

【発明の効果】本発明により、免疫増強等の薬効も高く、かつ風味も良好な乳酸発酵食品を得ることが可能になった。すなわち、乳酸菌と酵母菌を共棲培養し、かつ\*

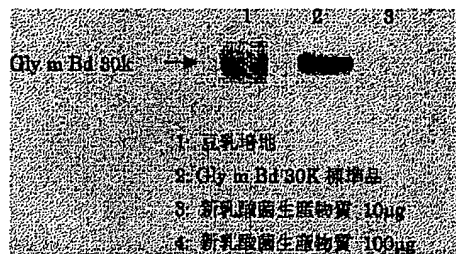
\* 乳酸菌の菌種を適切に選択することにより、免疫活性作用と食品としての風味とを両立させることを可能にしたものである。

【0074】本発明に係る大豆の乳酸発酵物は、マクロファージからのNO産生能促進活性や食能亢進活性に優れ、かつ腫瘍転移抑制活性を有するため、天然物由来の免疫増強剤や抗腫瘍剤として有用である。また、大豆中のアレルゲンが分解・消去されるため、低アレルゲン化大豆食品を得ることができる。

10 【図面の簡単な説明】

【図1】本実施例において、大豆アレルゲンの検出を行った結果を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

A 61 P 37/04

識別記号

F I

A 61 P 37/04

ターコード (参考)

(72)発明者 鈴木 光政

東京都渋谷区道玄坂1丁目19番11号セビア  
ビル6階日本バイオ株式会社内

(72)発明者 小川 正

滋賀県大津市京町3-3-17

Fターム(参考) 4B018 MD58 MD81 MD86 ME08 ME14

MF13

4B020 LC05 LG05 LK17 LK18 LP18

LP20

4C087 AA01 AA02 BC12 BC57 BC58

BC60 BC62 CA09 CA10 ZB09

ZB26

4C088 AB59 AC04 AD22 ZB09 ZB26